

リファンピシン単独耐性結核菌の分子疫学的解析

¹吉田志緒美 ¹露口 一成 ²鈴木 克洋 ³富田 元久
¹岡田 全司 ²林 清二 ⁴岩本 朋忠

要旨：〔目的〕リファンピシン（RFP）単独耐性結核菌の遺伝子解析。〔方法〕初回・既治療を合わせた新規入院患者由来結核菌4,633株中RFPのみ耐性であった15株を用いてhot spotを含む*rpoB*遺伝子シーケンス解析を行い、VNTRによる各菌株の遺伝的異同を検討した。〔結果〕15株中14株にコードン531, 526, 516, 533上の*rpoB*変異が認められた。また、VNTRにより同一パターンを示すグループの存在が明らかとなった。〔考察〕今回全体に占めるRFP単独耐性菌の割合は低いため、これらの株が市中伝播している可能性は低い、経年的に散発している傾向にあり、RFP単独耐性株の地域拡散が懸念された。

キーワード：結核菌, Rifampicin, *rpoB* 遺伝子, 薬剤感受性検査, VNTR

はじめに

わが国の2009年における全結核患者数は24,170人であり、罹患率は10万対19.0と前年と比べて約2%の減少にとどまっている¹⁾。また、治療が困難な多剤耐性結核菌（MDR-TB）感染は結核対策上の重要な問題であるが、2002年の結核療法研究協議会が実施した全国調査によると、多剤耐性率は初回・再治療を合わせて1.9%（60/3,122）となっている²⁾。2009年結核サーベイランスによる新登録肺結核菌培養陽性患者による登録時薬剤感受性結果から初回・再治療を合わせた多剤耐性率は0.8%（56/6,920）であり、多剤耐性率の減少がみられるが20～40歳代の年代層に耐性結核患者が目立つ¹⁾。これに対して世界では、2008年には44万人がMDR-TB感染であるとされ、2009年の結核新規登録患者940万人の3.3%がMDR-TBであると推定されている（WHO推計）³⁾。世界の結核罹患状況から鑑みて、わが国は中蔓延国ではあるが先進国の中では依然高く、地域的に耐性結核菌の増加が懸念されている高蔓延地域に囲まれている環境上、耐性結核菌の早期発見と適切な治療は重要な意味をもつ。

MDR-TBが生まれる背景として、不十分な服薬や中断による獲得耐性が挙げられ、それらの患者は2～3%の

割合で再発すると言われている⁴⁾。一方、不幸にも耐性結核の患者から感染を受けて発病した人は最初から薬剤耐性になってしまう。このような薬剤耐性結核の拡大防止のために、公衆衛生の強化と並んで耐性結核菌の病原性や発症原因に関する研究が従来から行われているが、結核治療において重要な治療薬の一つであるイソニアジド（INH）の単剤耐性結核菌は世界的に高い頻度で分離されているのに比べ、同じく一次抗結核薬であるリファンピシン（RFP）単独耐性の分離頻度は稀であるため、原因究明のための充分な解析がなされていない。本研究では、当センターで分離できたRFP単独耐性結核菌の耐性遺伝子変異と分子疫学的解析を行い、その実態に迫った。

方 法

〔対 象〕

2001～2009年の間、当センターに新規入院患者由来でBACTEC MGIT960システム（日本ベクトン・ディッキンソン）と小川KY培地（セロテック）を用いた培養検査で陽性となり、小川培地上でコロニー性状を確認、さらに自家製PNB培地で複数菌の混在を否定した後、アンプリコア・マイコバクテリウムツベルクローシス（ロ

¹独立行政法人国立病院機構近畿中央胸部疾患センター臨床研究センター、²同内科、³同臨床検査科、⁴神戸市環境保健研究所

連絡先：吉田志緒美，独立行政法人国立病院機構近畿中央胸部疾患センター臨床研究センター，〒591-8555 大阪府堺市北区長曾根町1180（E-mail: dustin@kch.hosp.go.jp）
(Received 27 May 2011/Accepted 13 Oct. 2011)

シュ・ダイアグノスティックス)とキャピリアTB(タウンズ)を用いて結核菌群と同定された4,633株を対象とした。これらの株は一度も治療歴のない初回治療患者由来の3,644株と過去に治療歴のある既治療患者由来の989株に分類された。これらの株を再培養し、単一コロニーを採取した後、BACTEC MGIT960 AST(日本ベクトン・ディッキンソン)とウエルパック-S(日本ビーシー)を用いて薬剤感受性検査結果を確認した。MGIT-AST法と小川比率法の結果がともにRFP耐性、INH感受性とされた15株を遺伝子解析の対象とし、MGIT-ASTでINH(0.1 µg/ml)耐性、小川比率法でINH低濃度(0.2 µg/ml)感受性となった3株は対象から外した。

[RFP耐性 *rpoB* 遺伝子のシーケンス解析]

Kimらの方法⁵⁾に準じてRFP単独耐性結核菌のシーケンス解析を行った。プライマーセットはMF(5'-CGA CCACTTCGGCAACCG)とMR(5'-TCGATCGGGCACA TCCGG)を用い、hot spotの81-bpを含む306-bpの*rpoB*遺伝子領域を3500 Genetic Analyzer(Applied Biosystems)を用いて解析した。得られたデータはBlast解析により、データベースと比較検討した。

[VNTR解析]

Supplyら⁶⁾によって提唱された国際標準法である15 MIRU-VNTRと、国内標準法として提唱されているJATA12-VNTR⁷⁾に加えて、わが国で高い分解能をもつ超多変領域(Hypervariable, HV)の3領域⁸⁾を用いて遺伝子型別比較を行った。15MIRU-VNTRとJATA12-VNTRはアガロースゲル電気泳動とキャピラリー電気泳動(Agilent Technologies), HV領域は3500 Genetic Analyzerを用いてPCR産物の分子量を算出し、コピー数の換算を行った。

結 果

[RFP単独耐性結核菌の分離頻度]

初回治療患者由来3,644株に占めるRFP単独耐性結核菌の分離頻度は0.4%(13株)、INH単独耐性は3.6%(132株)、MDR-TBは1.1%(40株)であった。一方、既治療患者由来989株における分離頻度は順にRFP単独耐性0.2%(2株)、INH単独耐性は4.6%(45株)、MDR-TBは9.1%(90株)であった。

[*rpoB* シーケンス解析結果]

RFP単独耐性結核菌15株中14株は*rpoB*遺伝子領域に変異を認めた。これらの株はコドン531に変異を保有する9株と526に変異のある3株、516と533に変異が認められた各1株ずつであった。*rpoB*遺伝子解析で野生型であった1株はMIC測定で32 µg/ml以上と判定されたため、今回解析対象とした*rpoB*遺伝子領域以外に変異をもっていると考えられた(Table)。

[VNTR解析]

15株のうちすべての領域でVNTRのコピー数が一致した2株で構成されるグループAと、3株で構成されるグループBが認められ、残り10株はそれぞれに異なるVNTRパターンを示した。また、今回クラスターを形成しなかった菌株No.207のVNTRパターンは当センターにおける既治療MDR-TB患者2名の由来株と同一であった(Table)。

考 察

多剤耐性結核や慢性持続排菌者となる原因の一つに既に耐性菌感染であることを知らずに治療して、残りの感受性である薬剤を次々に耐性化させてしまうといった人為的な要素が考えられる。現在の結核治療では単剤治療は禁忌であり薬剤感受性検査で耐性薬剤を確認することは必須であるが、迅速に耐性菌を検出するにはRFP耐性株の約95%が変異を有する*rpoB*遺伝子のコドン507からコドン533までの27個のアミノ酸(hot spot領域:81 bp)の遺伝子変異を解析して耐性を確認する方法が有益である⁹⁾。今回の研究結果から、RFP単独耐性結核菌の93.3%に*rpoB*遺伝子変異が認められ、いずれもhot spot内の変異であることが認められた。*rpoB*遺伝子変異の割合は高い順にコドン531(60%), 526(20%), 533と516(各6.7%)となり、当センターのMDR-TBの割合〔コドン531(62.9%), 526(20%), 533(5.7%), 516(2.9%):データ未掲載〕とわが国のMDR-TBの割合¹⁰⁾とほぼ同じとなった。しかし、RFP単独耐性結核菌が少ないためMDR-TBとの間に何らかの有意な違いが示しにくく、さらに患者背景等を考慮せねばならないことから直ちに結論付けることは難しい。

わが国の2002年の全国調査で、未治療患者の8.6%、既治療患者の25.2%は主要な抗結核薬のいずれか一つに耐性をもっており、未治療患者の0.2%、既治療患者の0.5%はRFPにのみ耐性をもっているという²⁾。これらのRFP単独耐性率は、INH単独耐性率(未治療群1.2%、既治療群6.2%)、MDR-TB率(未治療群0.7%、既治療群9.8%)に比べて低いが、未治療群よりも既治療群のほうが高い。本研究で得られた未治療患者におけるRFP単独耐性、INH単独耐性、MDR-TBの耐性率(順に0.4%, 3.6%, 1.1%)と既治療患者群の耐性率(順に0.2%, 4.6%, 9.1%)を比べるとほぼ既治療患者群のほうが高く矛盾しない。唯一、既治療群のRFP単独耐性率が未治療群より低いのは菌株数の少なさに影響されたと思われる。しかし、国際的には既治療患者のRFP単独耐性率は高い傾向がうかがえ^{11)~13)}、多剤耐性化を未然に防ぐためにRFP単独耐性結核患者が発見された場合は他の耐性結核と同じく慎重に、適切な治療を施す必要がある。

Table Profiles of variable number of tandem repeat (VNTR) recognized as 15 rifampicin mono-resistant *M. tuberculosis* isolates and H37Rv and distribution of the *rpoB* mutations

Isolates no.	Date (YY/MM/DD)	JATA12 (No./Alias (15MIRU-VNTR))												Hypervariable (HV)				Locus for international comparison*						Identical group	Mutation codon no. (the change in nucleotide sequence)
		J01	J02	J03	J04	J05	J06	VNTR 2372	M26	Q15	M31	Q3336	J10	J11	J12	Q3232	Q3820	Q4120	M04	M16	M40	EC	t30		
153	2005/02/03	4	3	3	3	6	3	7	4	7	5	8	3		15	19	6	2	4	3	4	4	3		526 (cac→gac)
394	2005/04/15	3	3	4	3	5	3	7	2	5	15	9	2		15	9	8	2	3	2	4	4	3		531 (tcg→ttg)
519	2005/06/07	4	1	3	2	9	4	9	4	5	7	8	5		16	14	12	2	3	3	4	4	3		516 (gac→gtc)
852	2005/09/20	4	8	3	2	7	4	7	4	4	10	8	2		10	12	3	2	2	3	4	2	1	A	531 (tcg→ttg)
210	2006/02/27	4	1	3	2	6	4	7	4	3	8	8	5		30	16	9	2	3	3	4	4	4		526 (cac→ctc)
883	2006/10/13	4	8	3	2	7	4	7	4	4	10	8	2		10	12	3	2	2	3	4	2	1	A	531 (tcg→ttg)
929	2006/10/30	4	3	4	3	6	3	4	4	5	7	8	3		13	20	10	2	3	3	4	4	3	B	531 (tcg→ttg)
1045	2006/12/07	2	3	1	3	4	2	5	1	3	12	6	5		5	5	2	2	3	1	4	2	4		none
441**	2007/06/14	4	3	3	2	7	3	7	4	5	7	9	5		15	12	9	2	3	3	4	4	3		531 (tcg→ttg)
207	2008/03/05	4	3	4	3	4	3	7	4	5	7	8	3		14	14	8	2	3	3	4	4	3	***	531 (tcg→ttg)
413	2008/05/29	4	3	4	3	6	3	4	4	5	7	8	3		13	20	10	2	3	3	4	4	3	B	531 (tcg→ttg)
21**	2008/12/17	5	3	2	2	7	3	7	4	5	7	9	5		15	12	8	2	3	3	4	4	4		526 (cac→tac)
103	2009/02/02	3	3	4	3	5	3	7	2	4	17	9	5		12	9	8	2	3	2	4	4	3		533 (ctg→cag)
923	2009/11/27	4	3	4	3	6	3	4	4	5	7	8	3		13	20	10	2	3	3	4	4	3	B	531 (tcg→ttg)
739	2009/12/07	4	2	4	3	6	1	7	4	5	7	8	4		15	18	10	2	3	3	4	4	3		531 (tcg→ttg)
H37Rv		2	3	1	4	5	2	3	4	3	8	5	3		4	3	2	3	2	1	4	2	5		

*The six loci composed the international Supply's 15MIRU-VNTR by combination with JATA12-VNTR.

**The patients were classified as previously treated.

***The VNTR pattern were concordant with pattern of MDR-TB strains from 2 patients.

RFP単独耐性結核患者のリスクファクターは他の抗結核薬と同様、結核の治療歴の有無、服薬コンプライアンスの低下や不適切な治療による獲得耐性、HIV複合感染患者におけるINH、エタンブトール(EB)の吸収阻害(malabsorption)から生じるRFP耐性化¹⁾などが挙げられる。今回の対象はすべてHIV検査陰性であり、1名の既治療患者(No.441)以外は過去に結核症や結核以外の感染症でRFPを用いた化学療法を施された形跡はなかった。既治療患者No.441の初回治療時の感受性は不明だったが標準治療が施されており、同じく既治療のNo.21は初回治療時に既にRFP単独耐性であり、仮にRFP耐性化した株に感染したと考えるならば、これらの菌は伝播力が高い株であると思われる。同じVNTRパターンをもつグループAの2患者は、大阪府南部の隣接した市町村に居住していたが菌の分離時期は1年以上離れ、直接の接触歴も認められなかったため、実際同一菌株かどうかははっきりしない。しかし、結核菌が長期的に休眠と再燃を繰り返しながら広範囲に拡散し伝播する病原体であることから、地域で同一のRFP単独耐性結核菌が蔓延している可能性は拭いきれない。グループBの菌株も約4年間に散発しており、グループAと同様に同一クローン株である可能性が示唆され、地域内で感染拡大している危険性は無視できない。また、今回クラスターを形成しなかった菌株No.207と2名の既治療MDR-TB患者由来株は同じVNTRパターンを有していたが、両者に接触歴がないことからNo.207の多剤耐性誘導の可能性が示唆された。したがって、RFP単独耐性を含む耐性結核患者が関与する感染事例が発生した際には、接触者検診対象者に対する潜在性結核治療の徹底が求められる。

結核治療において、過去の結核治療歴や薬剤耐性を有する患者との接触の可能性、その地域での薬剤耐性状況等の情報を把握し薬剤耐性を有している可能性を常に考慮することは自明である。本研究から、上記の項目に加えて、耐性結核菌の分子生物学的特徴の把握と分子疫学解析の継続的な展開の重要性が示唆された。

文 献

- 1) 厚生労働省:「結核の統計 2010年版」. 結核予防会, 2010.
- 2) Tuberculosis Research Committee (Ryoken): Drug-resistant

- Mycobacterium tuberculosis* in Japan: a nationwide survey, 2002. Int J Tuberc Lung Dis. 2007 ; 11 : 1129-1135.
- 3) World Health Organization: Global tuberculosis control 2010. World Health Organization, Geneva, 2010.
- 4) Chang KC, Leung CC, Yew WW, et al.: Dosing schedules of 6-month regimens and relapse for pulmonary tuberculosis. Am J Respir Crit Care Med. 2006 ; 174 : 1153-1158.
- 5) Kim BJ, Lee SH, Lyu MA, et al.: Identification of *Mycobacterial* Species by Comparative Sequence Analysis of the RNA Polymerase Gene (*rpoB*). J Clin Microbiol. 1999 ; 37: 1714-1720.
- 6) Supply, P, Allix C, Lesjean S, et al.: Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol. 2006 ; 44 : 4498-4510.
- 7) 前田伸司, 村瀬良朗, 御手洗聡, 他: 国内結核菌型別のための迅速・簡便な反復配列多型(VNTR)分析システム—JATA(12)-VNTR分析法の実際. 結核. 2008 ; 83 : 673-678.
- 8) Iwamoto T, Yoshida S, Suzuki K, et al.: Hypervariable loci that enhance the discriminatory ability of newly proposed 15-loci and 24-loci variable-number tandem repeat typing method on *Mycobacterium tuberculosis* strains predominated by the Beijing family. FEMS Microbiol Lett. 2007 ; 270 : 67-74.
- 9) Musser JM: Antimicrobial agent resistance in mycobacteria: molecular genetic insights. Clin microbial Rev. 1995 ; 8 : 496-514.
- 10) Hirano K, Abe C, Takahashi M: Mutations of *rpoB* gene of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated mostly in Asian countries and their rapid detection by line probe assay. J Clin Microbiol. 1999 ; 37 : 2663-2666.
- 11) Mulenga C, Chonde A, Bwalya IC, et al.: Low occurrence of tuberculosis drug resistance among pulmonary tuberculosis patients from an urban setting, with a long-running DOTS program in Zambia. Tuberculosis Research and Treatment. 2010 ; 2010 : 1-6.
- 12) Khuê PM, Truffot-Pernot C, Texier-Maugein J, et al.: A 10-year prospective surveillance of *Mycobacterium tuberculosis* drug resistance in France 1995-2004. Eur Respir J. 2007 ; 30 : 937-944.
- 13) The World Health Organization: WHO/IUATLD Global project on anti-tuberculosis drug resistance surveillance. Anti-tuberculosis drug resistance in the world, Report No.4. 2008 ; WHO/HTM/TB/2008. 394 : Annex 1.

Short Report

MOLECULAR EPIDEMIOLOGY OF RIFAMPICIN MONO-RESISTANT
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

¹Shiomi YOSHIDA, ¹Kazunari TSUYUGUCHI, ²Katsuhiro SUZUKI, ³Motohisa TOMITA,
¹Masaji OKADA, ²Seiji HAYASHI, and ⁴Tomotada IWAMOTO

Abstract [Purpose] We aimed to investigate the prevalence and possible transmission routes of rifampicin (RFP) mono-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains.

[Methods] Drug susceptibility testing was used to identify 15 RFP-resistant strains out of 4,633 *M.tuberculosis* isolates. Sequencing of the *rpoB* gene and VNTR analysis were performed to further confirm the genetic classification.

[Results] Resistance-conferring mutations in the RFP resistance-determining region (RRDR) of the *rpoB* gene were found in 14 of the 15 strains with phenotypic RFP mono-resistance. VNTR analysis revealed 2 clusters of 5 identical strains each.

[Conclusions] Although the community prevalence of RFP mono-resistant *M.tuberculosis* is low, the results of VNTR analysis suggested that rather than being recently transmitted,

these strains may have been widely transmitted as latent infections in the population.

Key words : *Mycobacterium tuberculosis*, Rifampicin, *rpoB* gene, Drug susceptibility testing, VNTR

¹Clinical Research Center, ²Department of Respiratory Medicine, ³Department of Clinical Laboratory, National Hospital Organization Kinki-chuo Chest Medical Center, ⁴Kobe Institute of Health

Correspondence to: Shiomi Yoshida, Clinical Research Center, National Hospital Organization Kinki-chuo Chest Medical Center, 1180 Nagasone-cho, Kita-ku, Sakai-shi, Osaka 591–8555 Japan. (E-mail: dustin@kch.hosp.go.jp)